

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-069967

(43) Date of publication of application : 07.03.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
// C12N 1/20
C12N 1/21
C12N 9/02
(C12N 15/09
C12R 1:38
C12R 1:01)
(C12N 1/20
C12R 1:38)
(C12N 1/20
C12R 1:01)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 9/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 10-297665

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 27.08.1998

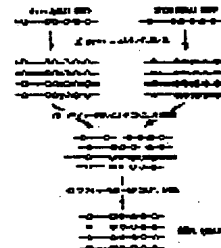
(72)Inventor : FURUKAWA KENSUKE
KUMAMARU TETSUYA

(54) GENE ENCODING ENZYME DECOMPOSING PCB AND ITS RELATED COMPOUND

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a chimeric gene capable of efficiently decomposing many kinds of PCB compound and useful e.g. for environmental purification by encoding the terminal dioxygenase large subunit of biphenyl dioxygenase decomposing PCB and the like.

SOLUTION: This chimeric gene is obtained by recombining a gene encoding the terminal dioxygenase large subunit derived from different kinds of PCB-decomposing bacteria, such as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF strain and *Burkholderia cepacia* LB 400 strain through DNA shuffling and encodes the terminal dioxygenase large subunit of biphenyl dioxygenase decomposing PCB and its related compounds. This chimeric gene encodes an amino acid sequence of formula I and consists of a base sequence of formula II.



Bel Des Der Ber Bin Bro Bus But Buz Buz Buz Buz Buz
 5 12 18
 For not Tis The Ten To U A U A U A U A U A U A U A U A U A
 25 25 30
 *
 Bus Buz Bin Bin Bin Bin Bin Bus But Buz Buz Buz Buz Buz
 45 50 55
 But Buz But But But But But But But But But But But But
 65 70

[illegible]

©2000, 1. Aufl. Alle Rechte vorbehalten. Nachdruck, Vervielfältigung und Verbreitung, auch auszugsweise, ist ohne schriftliche Genehmigung des Verlages. Printed in Germany. 9783708913209

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-69967

(P2000-69967A)

(43) 公開日 平成12年3月7日(2000.3.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 N 1/20		1/20	F
	Z A B		Z A B D
1/21		1/21	
9/02		9/02	

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-297665

(22) 出願日 平成10年8月27日(1998.8.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年3月5日
 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 第
 72巻臨時増刊号」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 古川 謙介

福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大
学 農学部農芸化学科内

(72) 発明者 熊丸 哲也

福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大
学 農学部農芸化学科内

(74) 代理人 100087675

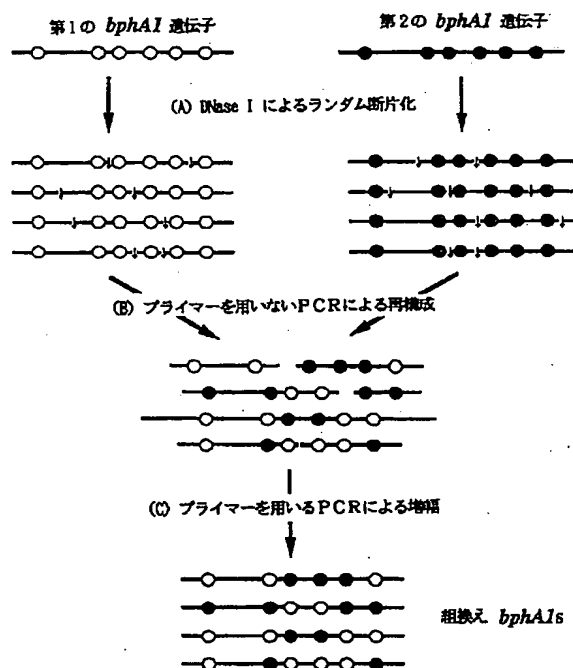
弁理士 筒井 知

(54) 【発明の名称】 P C Bおよび関連化合物を分解する酵素をコードする遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 可及的多種類のP C B (ポリ塩化ビフェニル) 化合物の分解に寄与し得るP C B分解遺伝子の取得によるP C Bの効率的な分解技術の提供。

【解決手段】 異種のP C B分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子をDNAシャフリングにより組換えることによって得られ、広範なP C B及び関連化合物(ベンゼン、トルエン、ジフェニルメタン、ジベンゾフラン等)を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしているキメラ遺伝子。キメラ遺伝子を得るための異種のP C B分解菌の好ましい例は、シュードモナス・シュードアルカリゲネスK F 7 0 7株及びバーコルデリア・セバシアL B 4 0 0株である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 異種の PCB 分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子を DNA シャプリングにより組み換えることによって得られ、PCB および関連化合物を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしていることを特徴とするキメラ遺伝子。

【請求項 2】 異種の PCB 分解菌が、シュードモナス・シュードアルカリゲネス K F 707 株およびバーコルデリア・セバシア L B 400 株である請求項 1 の遺伝子。

【請求項 3】 配列番号 1 のアミノ酸配列をコードしている請求項 2 の遺伝子。

【請求項 4】 配列番号 2 の塩基配列から成る請求項 3 の遺伝子。

【請求項 5】 配列番号 3 のアミノ酸配列をコードしている請求項 2 の遺伝子。

【請求項 6】 配列番号 4 の塩基配列から成る請求項 5 の遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、環境汚染物質である PCB およびその関連化合物の効率的な分解を触媒する酵素タンパク質をコードする新規な遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】PCB（ポリ塩化ビフェニル）は、絶縁剤、熱媒体、塗料、感圧紙などに広く使用されていたが、その有害性が指摘されて以来、生産は中止されている。しかしながら、過去に大量に生産された一部の PCB は、未処理のまま廃棄されて土壌や地下水を汚染したり、ゴミ燃焼によりダイオキシンを発生して大気汚染をもたらす深刻な社会問題となっている。

【0003】PCB はビフェニルに塩素ガスを直接吹きつけて製造され、塩素の付加する数（1～10）と置換位置の違いにより理論上、209 種類の化合物ができるが、いずれも、化学的にきわめて安定であるので、これを処理して無害化することは非常に困難である。PCB の無害化処理には、高温で完全に焼却したり、硫黄を加えて加熱し樹脂状の化合物にする等の方法が提示されているが、これらの方法は、自然環境に放出された PCB の処理には適用できない。自然環境中に薄く広がった PCB の処理は自然界に存在する微生物による分解にまたねばならない。微生物は古来より環境に存在する多種多様な物質を分解資化する機能を獲得してきたので、これを利用するのである。

【0004】PCB の分解については、ビフェニルを炭素源として生育する土壌細菌が広く存在し、これらが PCB を部分的に酸化分解（コメタボリズム）することが明らかにされて以来、世界中で多くの PCB 分解菌が分

離されている。これまで分離された PCB 分解菌はグラム陰性細菌が多いが、最近、グラム陽性細菌も分離されている。前者の例は *Pseudomonas*、*Burkholderia*、*Acinetobacter*、*Achromobacter* などであり後者は *Rhodococcus* である。これらの PCB 分解菌について、その分解機能が検討され、さらに、幾つかの菌株から PCB 分解遺伝子（PCB 分解を触媒する酵素をコードする遺伝子）も単離され塩基配列が決定されている。

【0005】土壌細菌による PCB の分解は、塩化安息香酸への酸化分解であり、この分解には 4 つの酵素が関与することが明らかにされている（古川ら、*Biodegradation* 5: 289-300 (1994)）。すなわち、酵素分子のビフェニル環への導入はビフェニルジオキシゲナーゼ（BP D ox）により触媒され、生じたジヒドロジオール化合物はデヒドロゲナーゼによりジオール（フェニルカテコール）へ変換される。次いで、環開裂ジオキシゲナーゼによりメタ開裂黄色化合物へと変換され、ヒドロラーゼにより塩化安息香酸へと分解される。

【0006】しかしながら、これまで分離された PCB 分解菌は、それぞれ、多種類存在する PCB 化合物のうち専ら特定の化合物を分解するにすぎない。例えば、代表的な PCB 分解菌株であるシュードモナス・シュードアルカリゲネス (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) K F 707 株とバーコルデリア・セバシア (*Burkholderiaceae*) L B 400 株とを比較すると、K F 707 株はパラ位に塩素置換した PCB などの塩素数 1～3 の低塩化 PCB を良く分解し、一方、L B 400 株は 2, 5 一位に塩素置換した PCB などの塩素数 4～5 の高塩化 PCB を分解する。PCB の効率的な分解には、多種類の PCB 化合物を同時に分解できるような PCB 分解遺伝子の存在が望まれるが、そのような遺伝子は未だ見出されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、可及的に多種類の PCB 化合物の分解に寄与し得るような PCB 分解遺伝子を取得して、PCB の効率的な分解を行うことのできる技術を確立することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上述の目的を達成するために研究を重ねた結果、各種の PCB 分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニット（末端ジオキシゲナーゼの大サブユニット）の遺伝子間でランダムな組換えを行うことにより、親株よりも広範な PCB 分解特性を示し、しかも、その他の化合物（以下、関連化合物という）も併せて分解することのできる PCB 分解遺伝子を得ることができることを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、異種の PCB 分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子を DNA シャプ

リングにより組み換えることによって得られ、PCBおよび関連化合物を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしていることを特徴とするキメラ遺伝子を提供する。

【0010】本発明のキメラ遺伝子を得るための異種のPCB分解菌の好ましい例は、シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株およびバーコルデリア・セバシアLB400株であり、これから得られるキメラ遺伝子の好ましい具体例は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子または配列番号2から成る遺伝子、および配列番号3のアミノ酸配列をコードする遺伝子または配列番号4から成る遺伝子である。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明が対象とするビフェニルジオキシゲナーゼ(BP Dox)は、多成分酵素であり、酵素を活性化し、基質に添加する末端ジオキシゲナーゼ(BphA1/BphA2)とNADHからの電子の伝達に関与するフェレドキシン(BphA3)とフェレドキシン還元酵素(BphA4)から構成される。末端ジオキシゲナーゼは鉄・硫黄を含むタンパク質であり、大サブユニット(BphA1)と小サブユニット(BphA2)の二つのサブユニットがA1₃A2₃のヘテロヘキサマーとして会合している(古川ら、Biodegradation 5: 289-300 (1994))。

【0012】そして、各種のPCB分解菌株を比較すると、それらの間にはBphA1における少数のアミノ酸に違いが存在するが、残りの構成成分は実質的に同一であることが明らかにされている(F. Mondello他、Appl. Environ. Microbiol., 63: 3039-3103 (1997))。例えば、上述のシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株とバーコルデリア・セバシアLB400株とでは、BphA1を構成する459個のアミノ酸のうち20個のアミノ酸が相違するが、BphA2は僅か1個のアミノ酸が違うのみで、BphA3およびBphA4は同一である(古川ら、J. Bacteriol. 179: 3936-3943 (1997))。

【0013】本発明者は、これらの事実に着目し、複数のPCB分解菌由来のBphA1をコードする遺伝子(bphA1)の間でランダムな組換えを行い親株のPCB分解菌と可及的に異なる配列のbphA1遺伝子が得られるようにすることにより、これまでに見出されたPCB分解菌に見られない広範なPCBの分解、さらにはその関連化合物の分解を触媒する酵素(キメラ酵素)をコードするキメラbphA1遺伝子を調製する手法を確立した。なお、本明細書において用いる「関連化合物」という語は、一般に、ベンゼン、トルエン、フェノールのような単一個のベンゼン環から成る芳香族化合物、およびビフェニル化合物(例えば、4-メチルビフェニル)、ジフェニル化合物(例えば、ジフェニルメタン、ジフェニルエタン)またはジベンゾ化合物(例え

ば、ジベンゾフラン)のような2個のベンゼン環から成る芳香族化合物を指称する。さらに、本発明に従えば、トリクロルエチレンのような低級脂肪族化合物の分解を触媒する酵素をコードするbphA1遺伝子を得ることも可能である。

【0014】本発明に従い、複数の異なるPCB分解菌由来のBphA1遺伝子間でランダムな組換えを生じさせキメラbphA1遺伝子を得るには、DNAシャフリングと呼ばれる手法を用いる。DNAシャフリングとは、Stemmerによって案出されたDNAの組換え法であり(W.P.C. Stemmer, Nature 370: 389-391 (1994); W.P.C. Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751 (1994))、組換えを行おうとする複数種の遺伝子を混ぜ合わせてランダムに断片化し、得られた小断片DNAに対しプライマーを入れない自己プライミングPCR(self-priming PCR)(PCR:ポリメラーゼ連鎖反応)を行わせて再構成したDNAを増幅することによりキメラDNAを調製するものである。

【0015】このようなDNAシャフリング法を用いて本発明のキメラbphA1遺伝子を構築する工程を図1に沿って説明すると次のようになる。

(1) 異種のPCB分解菌から得られた第1のbphA1遺伝子と第2のbphA1遺伝子とを混合し、DNase Iのようなエンドヌクレアーゼでランダムに断片化して、10~50bpのDNAを回収する(図1の(A))。

【0016】(2) 上記の工程で得られた小断片DNAにプライマーを用いないでPCRを行う。これによって、小断片DNA自身がお互いにプライマーとして働き、第1のbphA1遺伝子と第2のbphA1遺伝子が組み換えられて再構成された新たなbphA1キメラDNA群が得られる(図1の(B))。このPCR反応において用いるDNAポリメラーゼとしては、従来から一般的に使用されているTaq DNAポリメラーゼよりは、PfuやPwoのようなproofreading機能(ミスマッチした塩基の結合を校正する機能)を有するDNAポリメラーゼが好ましく、これによって、活性なビフェニルジオキシゲナーゼを発現するクローンを得る頻度が高くなる。

【0017】(3) 次いで、得られたキメラBphA1遺伝子を、bphA1のオリゴマーから成るプライマーを用いるPCRに供して増幅し、1.4kbの組換えキメラbphA1群を得る(図1の(C))。

【0018】(4) 以上のようなDNAシャフリング法によって得られた組換えbphA1遺伝子をbphA2A3A4BC(BP DoxにおいてBphA1に後続する酵素成分をコードする遺伝子)を有するプラスミドベクターの上流に連結し(図2参照)、これを大腸菌に形質転換し、ビフェニルから黄色化合物を生成するクローンを選択する。

【0019】(5) 選択したクローンの組換えbphA1遺伝子を上記(4)と同様にbphA2A3A4BCを有するプラスミドベクターの上流に連結し、これを大腸菌に導入、発現させ、その発現産物(通常は、大腸菌の静止菌体中に発現された酵素)について各種PCBおよび関連化合物の分解能を試験する。

【0020】本発明に従えば、以上のようにDNAシャフリングを利用して異種のPCB分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼ(BP Dox)の大サブユニット(末端ジオキシゲナーゼの大サブユニット:BphA1)をコードする遺伝子(bphA1)をランダムに組み換えることにより、PCBおよび関連化合物を分解するBP DoxのBphA1をコードするキメラbphA1遺伝子を得ることができる。本発明は、これまで分離されているようないずれのタイプのPCB分解菌にも適用できるが、PCB分解特性が互いに本質的に異なる異種のPCB分解菌、例えば、前述したような専ら低塩化PCBを分解するシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株タイプのPCB分解菌と高塩化PCBを分解するパーコルデリア・セバシアLB400株タイプのPCB分解菌を使用するのが好ましい。

【0021】本発明が適用される異種のPCB分解菌の組合せの特に好ましい例は、シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株とパーコルデリア・セバシアLB400株である。シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株は、北九州で分離され、FERM P-8297として寄託されている(古川ら、J. Bacteriol. 166: 392-398 (1986)参照)。また、パーコルデリア・セバシアLB400株は、米国ニューヨーク州で分離され、米国のアグリカルチュラル・リサーチ・センター(the Agricultural Research Center)に寄託番号NRRLB18064として寄託され同センターから入手できる(D. L. Bedard他、Appl. Environ. Microbiol. 51: 761-768 (1986); L. H. Bopp, J. Ind. Microbiol. 1: 23-29 (1986)参照)。

【0022】本発明に従いシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株とパーコルデリア・セバシアLB400株を用いて得られ、PCBおよび関連化合物を分解するBP DoxのキメラbphA1遺伝子の好ましい具体例は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、または配列番号2から成る遺伝子である。この遺伝子は、低塩化PCBおよび高塩化PCBのいずれにも優れた分解能を有するとともに、ジベンゾフランやジフェニルメタンのような化合物に対しても分解能を有するBP DoxのキメラbphA1遺伝子であることが確かめられている。

【0023】本発明に従いシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株およびパーコルデリア・セバシアLB400株から得られるキメラbphA1遺伝子の別の好ましい具体例は、配列番号3のアミノ酸配列を

コードする遺伝子または配列番号4から成る遺伝子である。この遺伝子は、低塩化PCBおよび高塩化PCBのいずれにも優れた分解能を有するとともに、ジベンゾフランやジフェニルメタンのような化合物、さらには、ベンゼンやトルエンのような単環芳香族化合物に対しても分解能を有するBP DoxのキメラbphA1遺伝子であることが確認されている。

【0024】以下、本発明をさらに説明するため、シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株(以下、単にKF707株という)とパーコルデリア・セバシアLB400株(以下、単にLB400株という)を用いて本発明のキメラ遺伝子を調製する場合の実施例を示すが、本発明の原理は他のPCB分解菌を用いる場合にも同様に適用され得るものである。

【0025】

【実施例】DNase Iによるランダム断片化: KF707株由来のbphA1とLB400株由来のbphA1の1:1 DNA混合物(全量2μg)を蒸留水で90μlに希釈し、これに10倍濃度バッファー液(1Mのトリス-HCl, pH7.5+10mMのMnCl₂)10μlを添加した。得られた反応物(最終容量100μl)を15℃で6分間、DNase I(0.15U/100μl; 宝酒造製)を用いて分解(断片化)した後、80℃で10分間加熱することにより分解反応を停止させた。分解反応後のDNAを2%の低融点アガロースゲル(宝酒造製)上で電気泳動させ、Whatman社(英国Maldstone 在)製DE81イオン交換紙を用いて10~50bpのDNA断片を回収した。1MのNaClを用いて溶出後、該DNAをフェノール/クロロホルム混合液(1:1)で抽出し、さらに冷エタノールで沈殿させた。

【0026】プライマーを用いないPCRによる再構成: 上記のようにして断片化されたDNA(100~200ng)を10μlのPCRプレミックス[5倍濃度Pfuバッファー液、各dNTP濃度0.4mM、0.1U/μlのPfuポリメラーゼ(米国カリフォルニア州La gollaのStratagene社製)]に添加してPCRを行った。PCRの各工程の条件は次のとおりであり、45サイクル実施した: 2本鎖DNAの変性、94℃で1分間; プライマーアニーリング、52℃で1.5分間; プライマー伸長、72℃で1分間。

【0027】プライマーを用いるPCRによる増幅: 上記のようなプライマーを用いないPCRにより得られた生成物に対して、bphA1遺伝子のプライマーを用いて再度PCRを実施した。用いたプライマーは、5'-CCGAATTCAAGGAGACGTTGAATCATGAGCTCAGC-3'(配列番号5)および5'-TTGAATTCTTCCGGTTGACAGATCT-3'(配列番号6)である。

【0028】上記のプライマーを用いないPCR生成物

の100倍希釈液の1 μ lを鋳型として25サイクルのPCRを行った。PCRの条件(最終容量50 μ l)は次のようにした:各プライマーの量50pmol、等倍濃度Taqバッファー液、2.2mMのMgCl₂、各dNTPの濃度0.2mM、Taq/Pfu(1:1)混合物の量1.25U。PCRの各工程の条件は、上記のプライマーを用いないPCRの場合と同じにした。但し、最終サイクルの伸長工程は10分間とした。0.7%のアガロースゲルを用いる電気泳動法により、1.4kbの増幅bphA1遺伝子が得られたことを確認した。

【0029】bphA1遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたPCR生成物をSacIおよびBglIIで酵素分解し、アガロースゲル電気泳動法により精製し、プラスミドベクターpJHF18 Δ MluIのSacI/BglII切断部位に連結した。得られた組換えプラスミドを大腸菌エシェリヒア・コリXL1-Blue(米国Stratagene社製)に形質転換し、50 μ g/mlのアンピシリンおよび0.1mMのイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを含有するLB寒天上にまいた。ビフェニル蒸気から環開裂黄色化合物を生成するコロニーを陽性クローンとして選択した。

【0030】なお、プラスミドベクターpJHF18 Δ MluIは、アンピシリン耐性遺伝子を含みKF707株由来のbphA1A2A3A4BC遺伝子を有するプラスミドpJHF18(古川ら、Gene 138:27-33)をMluIにより酵素分解しT4-DNAポリメラーゼでエンドフィリングすることによりbphA1遺伝子の部分を分解除去した(Δ bphA1)プラスミドであり、上記のようにDNAシャフリングで得られた組換えキメラbphA1遺伝子をSacIおよびBglIIの両方で酵素分解して該プラスミドと反応させると、該キメラbphA1遺伝子は Δ bphA1の部分に入りbphA2の上流に連結させることができる(図2参照)。

【0031】PCBおよび関連化合物の分解能試験

以上のようにして選択した陽性クローンのキメラbphA1遺伝子を上記と同様にプラスミドベクターpJHF18 Δ MluIのbphA2の上流に連結し、これを大腸菌エシェリヒア・コリJM109株(米国Stratagene社製)に導入、発現させた。すなわち、該形質転換大腸菌を対数増殖期(600nmにおける濁度0.8~1.2)まで培養した後、50mMのリン酸カリウムバッファー液(pH7.5)で2回洗浄し、さらに同じバッファー液20ml中に懸濁させて600nmにおける濁度1.0となるように調整した。

【0032】このようにして調製した大腸菌の静止菌体に、エタノールに溶かしたPCBおよび関連化合物を濃度20 μ g/mlとなるように添加した。1~6時間、200rpmで遠心分離して得た2mlの上清について、以下の波長における吸光度を測定することにより、各種のビフェニル化合物由来のメタ開裂黄色化合物の生

成量を調べた:ビフェニル434nm;4-メチルビフェニル437nm;ジフェニルメタン395nm;ジベンゾフラン(DF)465nm;2,2'-ジクロロビフェニル(2,2'-CB)393nm;2,5,4'-トリクロロビフェニル(2,5,4'-CB)412nm;4-クロロビフェニル(4CIBP)438nm。

【0033】なお、KF707株およびLB400株についても、同様に、大腸菌JM109株を用いる発現実験を行い、PCBおよび関連化合物の分解能試験を行った。その結果、クローニングにより選択された6種の陽性クローンのキメラbphA1遺伝子を含むプラスミドで形質転換された組換え大腸菌のうち2種は、特に優れたPCBおよび関連化合物に対する分解能を示した。

【0034】すなわち、組換え大腸菌のうち1種は、ビフェニルに対しては、KF707株の1.8倍、LB400株の2.3倍、4-クロロビフェニルに対してはKF707株の1.2倍、LB400株の1.5倍、4,4'-ジクロロビフェニルに対してKF707株の1.8倍(LB400株はこの化合物に対する活性を有しない)の分解活性を示した。また、2,5,4'-トリクロロビフェニルに対しては、LB400株と同様に2,5-ジクロロリングの3,4-位に酸素分子を導入(KF707株は4'-リングの2,3-位に導入)することができ、その活性は2.1倍であり、2,5,2',5'-テトラクロロビフェニルに対しては2,5-ジクロロリングの3,4-位にLB400株の0.8倍(KF707株はこの化合物に対する活性を有しない)の活性で酸素を導入し得ることも分かった。さらに、ジフェニルメタンに対してはKF707株の1.2倍(LB400株はこの化合物に活性なし)、ジベンゾフランに対してはLB400株の0.5倍(KF707株はこの化合物に活性なし)の活性を有していた。

【0035】このように、上記化合物の全てに対して高い分解活性を有する新規なビフェニルジオキシゲナーゼを発現するキメラbphA1遺伝子が得られたことが示された。得られた該キメラbphA1遺伝子をDNAシーケンサー(アプライドバイオシステム社製373A)により分析し、配列番号1のアミノ酸配列および配列番号2の塩基配列を有することを確認した。

【0036】また、組換え大腸菌の別の1種は、ビフェニルに対しては、KF707株の1.2倍、LB400株の1.5倍、4-クロロビフェニルに対しては、KF707株の1.2倍、LB400株の1.5倍、4,4'-ジクロロビフェニルに対しては、KF707株の1.8倍(LB400株はこの化合物に活性なし)の分解活性を示した。そして、2,5,4'-トリクロロビフェニルに対してはKF707株と同様、4'-クロロリングの2,3'-位で酸素分子を導入(LB400株は2,5-リングの3,4-位に導入)することができ、その活性は

1.5倍であることが示された。また、ジフェニルメタンに対してはKF707株の1.2倍(LB400株はこの化合物に活性なし)、ジベンゾフランに対しては、LB400株の0.3倍(KF707株はこの化合物に活性なし)の分解活性を有していた。

【0037】すなわち、この大腸菌の静止菌体中に発現されたBP Doxは上記化合物の全てに対して高い分解活性を有することが示された。さらに、この組換え大腸菌は、KF707株およびLB400株由来の酵素が全く分解できないベンゼン、トルエンに対しても分解活性を示し、インドールからインジゴを産生することが認められた。このキメラbphA1遺伝子をDNAシーケンサーで分析することにより配列番号3のアミノ酸配列および配列番号4の塩基配列を有することを確認した。

【0038】これらのPCB高分解性酵素コードするキ

メラbphA1のアミノ酸配列をKF707株、LB400株およびクローニングにより選択されたが分解能が低い他のキメラbphA1のアミノ酸配列と比較して示したのが図3である。図に示すように、本発明のPCB高分解性キメラbphA1〔図3のC(配列番号3または4に対応)およびD(配列番号1または2に対応)〕およびその他のキメラbphA1(図3のE~H)は、親株であるKF707株(図3のA)とLB400株(図3のB)の間で異なる20個のアミノ酸部分の塩基配列の組換えにより生じたものであり、異種のPCB分解菌由来のbphA1遺伝子のランダムなシャフリングにより試験したPCBおよびその関連化合物の分解に活性な新規なビフェニルジオキシゲナーゼ酵素が得られることが分かる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation
 <120> Genes encoding enzymes which catalyze decompositions of PCB and related compounds (PCBおよび関連化合物を分解する酵素をコードする遺伝子)
 <130> P0203T
 <160> 6
 <120> 1
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas pseudoalcaligenes
 Burkholderia cepacia
 <400> 1
 Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val
 5 10 15
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys
 20 25 30
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu
 35 40 45
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu
 50 55 60
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe
 85 90 95
 Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala
 100 105 110
 Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp
 115 120 125
 Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys
 130 135 140
 Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro
 145 150 155 160
 Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp
 165 170 175

11

12

Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro
 180 185 190
 Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile
 195 200 205
 Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala
 210 215 220
 Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu
 225 230 235 240
 Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser Gln Ala
 245 250 255
 Gln Ile Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Ala Trp Gly Gly His
 260 265 270
 Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met
 275 280 285
 Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu
 290 295 300
 Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly
 305 310 315 320
 Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn
 325 330 335
 Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp
 340 345 350
 Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Asn Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu
 370 375 380
 Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly
 385 390 395 400
 Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg
 405 410 415
 Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr
 420 425 430
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met
 435 440 445
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455

<210> 2

<211> 1377

<212> DNA

<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes
 Burkholderia cepacia

<400> 2

atgagctcat caatcaaaga agtcaggga gccctgtga agtgggttac caattggacg 60
 ccggaggcga tccgggggtt ggtcgatcag gaaaaagggc tgcttgatcc acgcatctac 120
 gccgatcaga gtctttatga gctggagctt gagcgggttt ttggtcgtc ttggctgtta 180
 cttgggcacg agagtcattg gcctgaaacc ggggacttcc tggccactta catgggcgaa 240
 gatccgggtg ttatgggtgc acagaaagac aagagcatca aggtgttcct gaaccagtgc 300
 cggcaccgcg gcatgcgtat ctgccgtcg gacgccggca acgccaaggc ttccacctgc 360
 agctatcacg gctgggccta cgacatcgcc ggcaagctgg tgaacgtgcc gtgcgagaag 420
 gaagcctttt gcgacaagaa agaaggcgac tgcggctttg acaaggccga atggggcccg 480

14

<400> 3

15

25

35

50

65

85

100

115

130

145

165

180

195

210

Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu

15

16

225 230 235 240
 Ser Gly Ile Leu Ala Ala Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser Gln Ala
 245 250 255
 Gln Ile Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His
 260 265 270
 Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met
 275 280 285
 Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Glu Leu
 290 295 300
 Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly
 305 310 315 320
 Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn
 325 330 335
 Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp
 340 345 350
 Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu
 370 375 380
 Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly
 385 390 395 400
 Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg
 405 410 415
 Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr
 420 425 430
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met
 435 440 445
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455

<210> 4

<211> 1377

<212> DNA

<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes
 Burkholderia cepacia

<400> 4

atgagctcat caatcaaaga agtgcaggga gcccctgtga agtgggttac caattggacg 60
 ccggaggcga tccgggggtt ggtcgatcag gaaaaagggc tgcttgatcc acgcatctac 120
 gccgatcaga gtctttatga gctggagctt gagcgggttt ttggtcgctc ttggctgtta 180
 cttgggcacg agagtcagt gcctgaaacc ggggacttcc tggccactta catgggcgaa 240
 gatccggtgg ttatggtgcg acagaaagac aagagcatca aggtgttctt gaaccagtgc 300
 cggcaccgcg gcatgcgtat ctgccgctcg gacgccggca acgccaaggc ttccacctgc 360
 agctatcacg gctgggccta cgacatcgcc ggcaagctgg tgaacgtgcc gttcgagaag 420
 gaagcctttt gcgacaagaa agaaggcgac tgcggctttg acaaggccga atggggcccg 480
 ctccaggcac gcgtggcaac ctacaagggc ctggtctttg ccaactggga tgtgcaggcg 540
 ccagacctgg agacctacct cgggtgacgc cggccctata tggacgtcat gctggatcgc 600
 acgccggccg ggactgtggc catcggcggc atgcagaagt ggggtattcc gtgcaactgg 660
 aagtttgccg ccgagcagtt ctgcagtgc atgtaccacg ccggcaccat gtcgcacctg 720
 tccggcatcc tggcgcccat gcgcccggaa atggacctct ccaggcgca gataccacc 780
 aaggccaacc agttccgggc cggctggggc gggcacggct cgggctggtt cgtcgacgag 840
 ccgggcatgc tcatggcggg gatgggcccc aaggtcacc agtactggac cgagggtccg 900

gctgccgagc ttgcggaaca gcgactgggc cacacatgc cggttcgacg catgttcggc 960
 cagcacatga gcgtcttccc gacctgctcg ttctctccgg ccatcaacac catccggacc 1020
 tggcacccgc gcggcccaaa cgaaatcgaa gtgtgggcct tcaccttggc ccatgccgat 1080
 gcccggccg agatcaagga agaatatcg cggcacaaca tccgcacatt ctccgcaggc 1140
 ggctgtttg agcaggacga tggcgagaac tgggtggaga tccagaaggg gctacgtggg 1200
 tacaaggcca agagccagcc gctcaatgcc cagatgggcc tgggtcggtc gcagaccggt 1260
 caccctgatt ttcttggaac cgtcggctac gtctacgcc aagaagcggc gcggggatg 1320
 taccaccact ggatgcgcat gatgtccgag cccagctggg ccacgctcaa gccctga 1377
 <210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
 <400> 5
 ccgaattcaa ggagacgttg aatcatgagc tcagc 35
 <210> 6
 <211> 25
 <213> DNA
 <213> *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
 <400> 6
 ttgaattctt ccggttgaca gatct 25

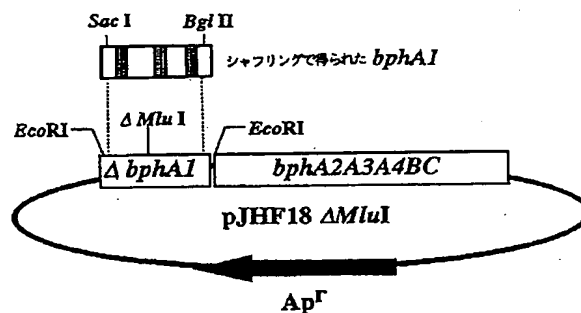
【図面の簡単な説明】

【図 1】 DNAシャフリング法により本発明のキメラ *bphA1* 遺伝子を調製する工程を概示する。

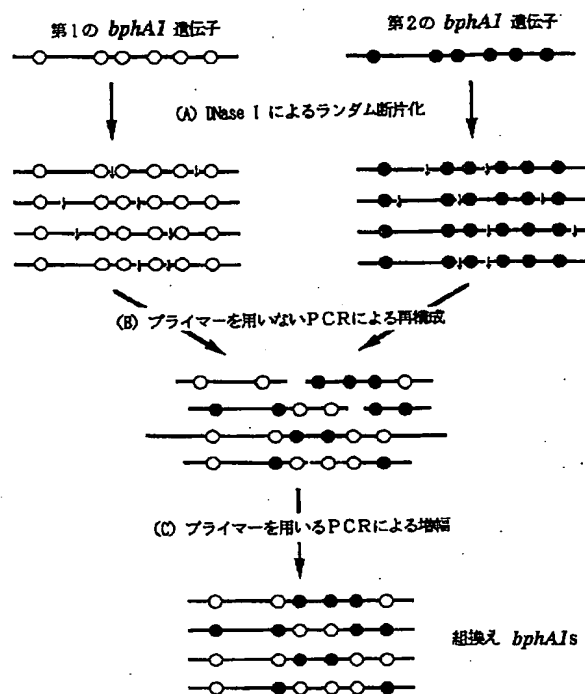
【図 2】 キメラ *bphA1* 遺伝子および親株の *bphA1* 遺伝子のクローニングおよび発現に用いるのに好適なプラスミドベクターの構成図である。

【図 3】 本発明のキメラ *bphA1* 遺伝子のアミノ酸配列を親株であるシュドモナス・シュドアルカリゲネス KF707 株、パーコルデリア・セバシア LB40 株、および DNA シャフリングで得られたその他のキメラ *bphA1* の遺伝子のアミノ酸と比較して示すものである。

【図 2】



【図1】



【図3】

A	S	MSM	HV	GF	MMD	-FSV	AITT	T
B	A	TTI	QI	AY	SLE	GVII	TFNI	N
C	S	MSM	QI	GF	MME	-FSV	AITT	T
D	S	MSM	QI	AF	MMD	-FSV	AITT	N
E	S	TTI	QI	AY	SLE	-FSV	AITI	N
F	S	MSM	HV	AF	MMD	GVSV	AITT	T [*] N
G	S	ITM	QI	AY	SLD	-FSV	AITT	N
H	S	MSM	QI	AY	SLD	-VTI	TFNI	N

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

(C12N 15/09

C12R 1:38

1:01)

(C12N 1/20

C12R 1:38)

(C12N 1/20

C12R 1:01)

識別記号

ZNA

FI

テーマコード* (参考)

(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 9/02
C 1 2 R 1:19)